

IFW



Docket No. 247264US0CONT/pmh

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Naoto TONOUCHI, et al.

GAU: 1642

SERIAL NO: 10/763,249

EXAMINER:

FILED: January 26, 2004

FOR: PEPTIDE-FORMING ENZYME GENE, PEPTIDE-FORMING ENZYME, AND
PEPTIDE PRODUCING METHOD

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT(S)

COMMISSIONER FOR PATENTS
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

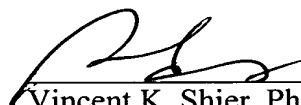
SIR:

Certified copies of the Convention Application(s) corresponding to the above-captioned matter:

- ☒ are submitted herewith
- ☐ were filed in prior application filed
were submitted to the International Bureau in PCT Application Number
- ☐ Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.
Norman F. Oblon



Vincent K. Shier, Ph.D.
Registration No. 50,552

Customer Number
22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 11/04)

Roland E. Martin
Registration No. 48,082

10/763, 249

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 1 年 7 月 2 6 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 1 - 2 2 6 5 6 8
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 1 - 2 2 6 5 6 8]

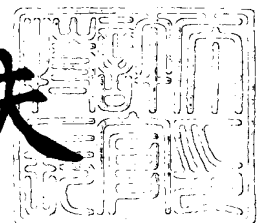
願 人 味の素株式会社
Applicant(s):

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

2 0 0 4 年 2 月 2 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 0 5 0 3 3

【書類名】 特許願

【整理番号】 PAMA-13170

【提出日】 平成13年 7月26日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07K 1/00
C07K 4/04
C12P 21/02

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社ア
ミノサイエンス研究所内

【氏名】 野崎 博之

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社ア
ミノサイエンス研究所内

【氏名】 吉良 郁夫

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社ア
ミノサイエンス研究所内

【氏名】 横関 健三

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089118

【弁理士】

【氏名又は名称】 酒井 宏明

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036711

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ジペプチドの製造方法、それに用いる L-アミノ酸アミドハイドロラーゼ、および、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼの製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 L-アミノ酸アミドと L-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、または、該微生物の菌体処理物を用いて、L-アミノ酸アミドおよび L-アミノ酸からジペプチドを製造することを特徴とするジペプチドの製造方法。

【請求項 2】 前記微生物は、バチルス属、コリネバクテリウム属、エルビニア属、ロドコッカス属、クリセオバクテリウム属、マイクロコッカス属、シュードモナス属、クリプトコッカス属、トリコスポロン属、ロドスポリジウム属、スポロブロマイセス属、トレメラ属、トルラスポラ属、ステリグマトマイセス属またはロドトルラ属に属することを特徴とする請求項 1 に記載のジペプチドの製造方法。

【請求項 3】 前記 L-アミノ酸アミドは、L-アラニンアミドであることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載のジペプチドの製造方法。

【請求項 4】 前記 L-アミノ酸は、L-グルタミンまたは L-アスパラギンであることを特徴とする請求項 1～3 のいずれか 1 つに記載のジペプチドの製造方法。

【請求項 5】 バチルス属、コリネバクテリウム属、エルビニア属、ロドコッカス属、クリセオバクテリウム属、マイクロコッカス属、シュードモナス属、クリプトコッカス属、トリコスポロン属、ロドスポリジウム属、スポロブロマイセス属、トレメラ属、トルラスポラ属、ステリグマトマイセス属またはロドトルラ属に属する微生物から得られ、かつ、L-アミノ酸アミドと L-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒することを特徴とする L-アミノ酸アミドハイドロラーゼ。

【請求項 6】 バチルス属、コリネバクテリウム属、エルビニア属、ロドコッカス属、クリセオバクテリウム属、マイクロコッカス属、シュードモナス属、クリプトコッカス属、トリコスポロン属、ロドスポリジウム属、スポロブロマイセ

ス属、トレメラ属、トルラスポラ属、ステリグマトマイセス属またはロドトルラ属に属する微生物を培地中で培養し、培地中および／または細胞中にＬ－アミノ酸アミドとＬ－アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するＬ－アミノ酸アミドヒドロラーゼを蓄積させることを特徴とするＬ－アミノ酸アミドヒドロラーゼの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、複雑な合成方法を経ることなく、簡便かつ安価にジペプチドを製造する方法に関し、より詳細には、Ｌ－アミノ酸アミドとＬ－アミノ酸とからジペプチドを製造する方法、当該ジペプチドの製造方法に使用するＬ－アミノ酸アミドヒドロラーゼおよびその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ジペプチドは、医薬品素材、機能性食品等のさまざまな分野で利用されている。例えば、Ｌ－アラニル－Ｌ－グルタミンは無血清培地の成分として有用であり、Ｌ－グルタミンに比べ安定で、水溶性も高いことから輸液成分に用いられる。

【0003】

ジペプチドの製造法としては従来から化学合成法が知られているが、その製造法は必ずしも簡便なものではなかった。例えば、Ｎ－ベンジルオキシカルボニルアラニン（以下Ｚ－アラニンと称する）と保護Ｌ－グルタミンを用いる方法（Bull. Chem. Soc. Jpn., 34, 739(1961)、Bull. Chem. Soc. Jpn., 35, 1966(1962)）、Ｚ－アラニンと保護Ｌ－グルタミン酸－γ－メチルエステルを用いる方法（Bull. Chem. Soc. Jpn., 37, 200(1964)）、Ｚ－アラニンエステルと無保護グルタミン酸を用いる方法（特開平1-96194号公報）、2-置換－プロピオニルハロイドを原料として、Ｎ－（2-置換）－プロピオニルグルタミン誘導体を中間体として合成する方法（特開平6-234715号公報）等が知られている。

【0004】

しかしながら、いずれの方法においても、保護基の導入脱離、もしくは中間体

の合成が必要であり、工業的に有利で十分に満足できる製造方法ではなかった。

【0005】

また、微生物酵素系を用いたジペプチドの製造法としては、Z-アスパラギン酸とフェニルアラニンのメチルエステルを用いる方法（特開昭53-92729号公報）、アスパラギン酸アミドとフェニルアラニンのメチルエステルを用いる方法（特開平10-136992号公報）が知られている。その他、酵素的プロセスによってジペプチドを生産する方法としてEPA0278787、WO90/01555が知られている。

【0006】

しかしながら、いずれの微生物酵素系においても、出発物質としてアミノ酸メチルエステルを用いる必要があり、比較的安価に入手可能な原料を用いて、工業的に有利かつ簡便な経路でジペプチドを製造する方法の開発が望まれていた。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、比較的安価に入手可能な出発原料を用いて、工業的に有利かつ簡便な経路でジペプチドを製造する方法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

上記目的に鑑み鋭意研究を重ねた結果、本発明者らは、ある種の微生物が、比較的安価に入手可能なL-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】

即ち、本発明は、以下のとおりである。

【0010】

（請求項1） L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、または、該微生物の菌体処理物を用いて、L-アミノ酸アミドおよびL-アミノ酸からジペプチドを製造することを特徴とするジペプチドの製造方法。

【0011】

(請求項2) 前記微生物は、バチルス属、コリネバクテリウム属、エルビニア属、ロドコッカス属、クリセオバクテリウム属、マイクロコッカス属、シュードモナス属、クリプトコッカス属、トリコスポロン属、ロドスポリジウム属、スポロブロマイセス属、トレメラ属、トルラスポラ属、ステリグマトマイセス属またはロドトルラ属に属することを特徴とする請求項1に記載のジペプチドの製造方法。

【0012】

(請求項3) 前記L-アミノ酸アミドは、L-アラニンアミドであることを特徴とする請求項1または2に記載のジペプチドの製造方法。

【0013】

(請求項4) 前記L-アミノ酸は、L-グルタミンまたはL-アスパラギンであることを特徴とする請求項1～3のいずれか1つに記載のジペプチドの製造方法。

【0014】

(請求項5) バチルス属、コリネバクテリウム属、エルビニア属、ロドコッカス属、クリセオバクテリウム属、マイクロコッカス属、シュードモナス属、クリプトコッカス属、トリコスポロン属、ロドスポリジウム属、スポロブロマイセス属、トレメラ属、トルラスポラ属、ステリグマトマイセス属またはロドトルラ属に属する微生物から得られ、かつ、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒することを特徴とするL-アミノ酸アミドヒドロラーゼ。

【0015】

(請求項6) バチルス属、コリネバクテリウム属、エルビニア属、ロドコッカス属、クリセオバクテリウム属、マイクロコッカス属、シュードモナス属、クリプトコッカス属、トリコスポロン属、ロドスポリジウム属、スポロブロマイセス属、トレメラ属、トルラスポラ属、ステリグマトマイセス属またはロドトルラ属に属する微生物を培地中で培養し、培地中および／または細胞中にL-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するL-アミノ酸アミドヒドロラーゼを蓄積させることを特徴とするL-アミノ酸アミドヒドロラ

ーゼの製造方法。

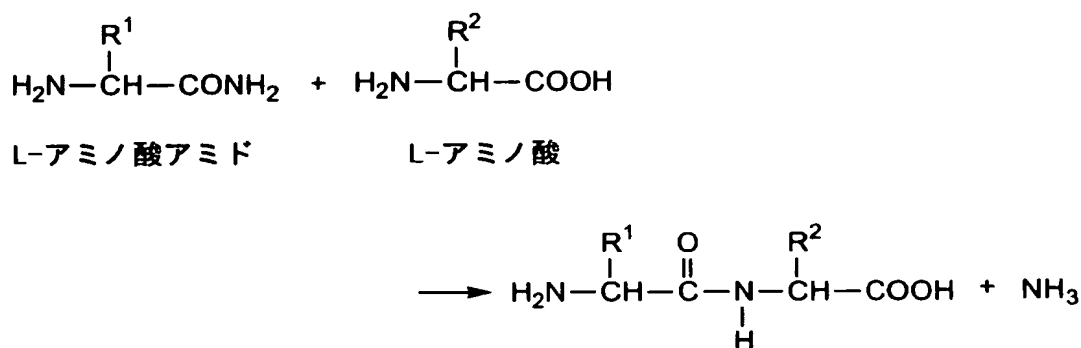
【0016】

【発明の実施の形態】

本発明のジペプチドの製造方法は、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、または、該微生物の菌体処理物を用いることを特徴とする。本発明のジペプチドの製造方法における反応は下記反応式により表される。

【0017】

【化1】



(R¹はL-アミノ酸アミドのアミノ酸側鎖を、R²はL-アミノ酸のアミノ酸側鎖を表す。)

【0018】

アミノ酸アミドは、市販品として比較的安価に入手可能な化合物である。アミノ酸アミドと無保護アミノ酸を出発原料として用いる本発明の方法は、従来にはない全く新しいジペプチドの製造方法であり、医薬品素材、機能性食品として有用なジペプチドをより安価に提供することを可能とするものである。

【0019】

以下、本発明のジペプチドの製造方法を、

〔I〕 L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物

〔II〕 L-アミノ酸アミドハイドロラーゼの性質

〔III〕 ジペプチドの製造方法

の順に添付の図面を参照して詳細に説明する。

【0020】

〔I〕 L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物

本発明に使用する微生物としては、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物を特に限定なく使用することができる。L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物としてはバチルス属、コリネバクテリウム属、エルビニア属、ロドコッカス属、クリセオバクテリウム属、マイクロコッカス属、シュードモナス属、クリプトコッカス属、トリコスポロン属、ロドスポリジウム属、スポロブロマイセス属、トレメラ属、トルラスポラ属、ステリグマトマイセス属、ロドトルラ属に属する微生物を挙げることができるが、具体的には以下のものを例示することができる。

【0021】

バチルス・メガテリウム	A J 3 2 8 4	F E R M	P - 1 8 4 2 1
(<i>Bacillus megateirum</i>)			
コリネバクテリウム・グルタミカム		A T C C	1 3 2 8 6
(<i>Corynebacterium glutamicum</i>)			
エルビニア・カロトボーラ	A J 2 7 1 9	F E R M	P - 1 8 4 2 0
(<i>Erwinia carotovora</i>)			
ロドコッカス・ロドクロス		A T C C	1 9 1 4 9
(<i>Rhodococcus rhodochrous</i>)			
クリセオバクテリウム・メニンゴセプチカム		A T C C	1 3 2 5 3
(<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>)			
マイクロコッカス・ルテウス		A T C C	9 3 4 1
(<i>Micrococcus luteus</i>)			
シュードモナス・サッカロフィラ		A T C C	1 5 9 4 6
(<i>Pseudomonas saccharophila</i>)			
クリプトコッカス・アルビドウス		I F O	0 3 7 8

(<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>albidus</i>)	
トリコスポロン・グラシル	A T C C 2 4 6 6 0
(<i>Trichosporon gracile</i>)	
ロドスポリジウム・ジオボヴァツム	A T C C 2 2 2 6 4
(<i>Rhodospiridium diobovatum</i>)	
スポロブロマイセス・サーモニカラー	I F O 1 0 3 8
(<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>)	
トレメラ・フォリアセア	I F O 9 2 9 7
(<i>Tremela foliacea</i>)	
トルラスポラ・デルブレッキイ	I F O 1 0 8 3
(<i>Torulaspora delbrueckii</i>)	
ステリグマトマイセス・エルヴィアエ	I F O 1 8 4 3
(<i>Sterigmatomyces elviae</i>)	
ロドトルラ・インゲニオサ	A T C C 2 2 9 9 3
(<i>Rhodotorula ingeniosa</i>)	

【 0 0 2 2 】

なお、バチルス・メガテリウム A J 3 2 8 4 株は、2 0 0 1 年 7 月 1 3 日に独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センターに寄託され、受託番号 F E R M - P 1 8 4 2 1 が付与された微生物である。また、エルビニア・カロトボーラ A J 2 7 1 9 株は、2 0 0 1 年 7 月 1 3 日に独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センターに寄託され、受託番号 F E R M - P 1 8 4 2 0 が付与された微生物である。

【 0 0 2 3 】

これらの微生物としては、野生株または変異株のいずれを用いてもよいし、また、細胞融合もしくは遺伝子操作などの遺伝学的手法により誘導される組み換え株等も用いることができる。

【 0 0 2 4 】

このような微生物の菌体を得るには、当該微生物を適当な培地で培養増殖せしめるとよい。このための培地はその微生物が増殖し得るものであれば特に制限は

なく、通常炭素源、窒素源、無機イオン、更に必要に応じ有機栄養源を含む通常の培地でよい。

【0025】

例えば、炭素源としては上記微生物が利用可能であればいずれも使用でき、具体的には、グルコース、フラクトース、マルトース、アミロース等の糖類、ソルビトール、エタノール、グリセロール等のアルコール類、フマル酸、クエン酸、酢酸、プロピオン酸などの有機酸類及びこれらの塩類、パラフィンなどの炭水化物類あるいはこれらの混合物などを使用することができる。

【0026】

窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウムなどの無機塩のアンモニウム塩、フマル酸アンモニウム、クエン酸アンモニウムなどの有機酸のアンモニウム塩、硝酸ナトリウム、硝酸カリウムなどの硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、コーンステープリカーなどの有機窒素化合物あるいはこれらの混合物を使用することができる。

【0027】

他に無機塩類、微量金属塩、ビタミン類等、通常の培地に用いられる栄養源を適宜混合して用いることができる。

【0028】

培地には、更にL-アミノ酸アミドを添加することにより、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する活性の高い菌体を得られる場合がある。

【0029】

培養条件にも格別の制限はなく、例えば、好氣的条件下にてpH 5～8、温度20～40℃の範囲でpHおよび温度を適当に制限しつつ12～48時間程度培養を行えばよい。

【0030】

〔II〕 L-アミノ酸アミドヒドロラーゼの性質

つぎに、上記微生物のうち、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC 13286から精製されたL-アミノ酸アミドヒドロラーゼの性質について説明す

る。

【0031】

当該L-アミノ酸アミドヒドロラーゼは、少なくともL-アラニンアミドを加水分解しL-アラニンを生成する活性、L-アラニンアミドとL-グルタミンを基質としL-アラニル-L-グルタミンを生成する活性、および、L-アラニンアミドとL-アスパラギンを基質としL-アラニル-L-アスパラギンを生成する活性を有するものである。

【0032】

作用としてはL-アラニンアミド1分子を加水分解して、L-アラニン1分子とアンモニア1分子を生成、L-アラニンアミド1分子とL-グルタミン1分子からL-アラニル-L-グルタミン1分子とアンモニア1分子を生成、L-アラニンアミド1分子とL-アスパラギン1分子からL-アラニル-L-アスパラギン1分子とアンモニア1分子を生成する。

【0033】

至適pHは6.0から10.0付近にあり、至適温度は30から50℃付近にある。サブユニットの分子量はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって42,000～46,000と算出される。

【0034】

〔III〕ジペプチドの製造方法

本発明のジペプチドの製造方法は、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、または、該微生物の菌体処理物を用いて、L-アミノ酸アミドおよびL-アミノ酸からジペプチドを製造するものである。

【0035】

上記微生物の産生するL-アミノ酸アミドヒドロラーゼは、L-アミノ酸アミドを加水分解してL-アミノ酸を生成する活性を有するとともに、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸を基質としてジペプチドを生成する活性を有するものである。

【0036】

図1は、本発明のジペプチドの製造方法のフローチャートである。

先ず、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物を培地中で培養し、培地中および／または細胞中にL-アミノ酸アミドハイドロラーゼを生成蓄積させる（ステップS1）。

次に、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼを回収・精製することによって精製L-アミノ酸アミドハイドロラーゼを製造する（ステップS2）。

続いて、ステップS2で生産した精製L-アミノ酸アミドハイドロラーゼまたはステップS1のL-アミノ酸アミドハイドロラーゼが蓄積された培地にL-アミノ酸アミドおよびL-アミノ酸を添加して反応を進行させることでジペプチドを大量に製造することができる（ステップS3）。

【0037】

上記微生物の産生するL-アミノ酸アミドハイドロラーゼをL-アミノ酸アミドおよびL-アミノ酸に作用せしめる方法としては、上記微生物を培養しながら、培養液中に直接基質を添加してもよいし、微生物培養物から遠心分離等により菌体を分離し、これをそのままもしくは洗浄した後、緩衝液に再懸濁したものにL-アミノ酸アミドおよびL-アミノ酸を添加して反応させてもよい。あるいは、ポリアクリルアミドゲル法、カラギーナン法、アルギン酸ゲル法等の公知の方法で固定化した菌体を用いることができる。

【0038】

また、微生物菌体の処理物として、菌体破碎物、アセトン処理菌体、凍結乾燥菌体を用いてもよい。菌体破碎には超音波破碎、フレンチプレス破碎、ガラスビーズ破碎等の方法を用いることができ、また溶菌させる場合には卵白リゾチームや、ペプチターゼ処理、またはこれらを適宜組み合わせた方法が用いられる。

【0039】

さらに、当該微生物菌体処理物からL-アミノ酸アミドハイドロラーゼを回収し、粗酵素液として使用してもよいし、必要に応じて、酵素を精製して用いてもよい。培養物からの精製法としては通常の酵素精製法をもちいることができる。具体的には遠心分離等によって菌体を集め、超音波処理、ガラスビーズ、ダイノミルなどの機械的方法によって菌体を破碎し、細胞片等の固形物を遠心分離によ

って除き、粗酵素を得て、超遠心分離分画、塩析、有機溶媒沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー等を行うことによって上述のL-アラニンアミドヒドロラーゼが精製される。

【0040】

すなわち、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する活性を有する画分であれば、酵素と当該酵素含有物全てを使用することが可能である。ここで「酵素含有物」とは、当該酵素を含むものであればよく、具体的には培養物、培養菌体、洗浄菌体、菌体を破碎あるいは溶菌させた菌体処理物、粗酵素液、精製酵素などを含む。

【0041】

なお、使用する微生物がバクテリア類に属する場合は、バクテリア類がジペプチドを生成すると同時に生成したジペプチドを分解することがあるため、微生物を培養しながらジペプチド生成反応を進行させるよりも菌体処理物、粗酵素液、精製酵素を用いてジペプチドを生成する方が好ましい場合がある。

【0042】

酵素または酵素含有物の使用量は、目的とする効果を発揮する量（有効量）であればよく、この有効量は当業者であれば簡単な予備実験により容易に求められるが、例えば洗浄菌体を用いる場合は反応液1リットル当たり1～500gである。

【0043】

L-アミノ酸アミドとしては、当該L-アミノ酸アミドヒドロラーゼの基質特異性において加水分解できるL-アミノ酸アミドであればいかなるものも使用でき、例えば、天然型のアミノ酸に対応したL-アミノ酸アミドだけでなく、非天然型のアミノ酸若しくはその誘導体に対応するL-アミノ酸アミドをも使用可能である。また、本発明で用いるL-アミノ酸アミドヒドロラーゼは、ラセミ体のアミノ酸アミドを不斉加水分解してL-アミノ酸を与えるため、ストレッカー法で安価に合成可能なラセミ体のアミノ酸アミドを用いることもできる。本発明においては、特にL-アラニンアミドを用いることが好ましい。

【0044】

L-アミノ酸としては、当該L-アミノ酸アミドハイドロラーゼの基質特異性においてL-アミノ酸アミドとジペプチドを形成するものであれば特に限定なく公知のものを使用できる。本発明においては、特にL-グルタミンまたはL-アスパラギンを用いることが好ましい。

【0045】

出発原料であるL-アミノ酸アミドおよびL-アミノ酸の濃度は各々1 mM～10 M、好ましくは0.1 M～2 Mであるが、L-アミノ酸アミドに対してL-アミノ酸を等量以上添加したほうが好ましい場合がある。また、必要ならば、例えば基質が高濃度だと反応を阻害するような場合には、反応の間、これらを阻害しない濃度にして逐次添加する事ができる。

【0046】

反応温度は10～70℃、好ましくは20～50℃であり、反応pHはpH2～12好ましくはpH3～11である。かくして2～48時間程度反応を行うことにより、反応混合物中にジペプチドが生成蓄積する。ジペプチド生成反応は平衡反応であるため、効率的生産を図るために生成するジペプチド、アンモニアを分離し、反応をさらに進行させてもよい。

【0047】

【実施例】

以下実施例をあげて、さらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、実施例におけるL-アラニン、L-アラニル-L-グルタミンまたはL-アラニル-L-アスパラギンの定量は高速液体クロマトグラフィーを用いる方法（カラム：GLサイエンス社製 Inertsil ODS-2、溶離液：リン酸水溶液（pH2.1）、2.5 mM 1-オクタンスルホン酸ナトリウム／メタノール＝10／1、流量：1.0 mL/min、検出210 nm）により行った。

【0048】

実施例1 L-アラニル-L-アスパラギンの製造

酵母エキス0.5% (w/v)、ペプトン0.5% (w/v)、グリセロール0.

5% (w/v)、塩化ナトリウム 0.5% (w/v)、L-アラニンアミド塩酸塩 0.5% (w/v) (pH 7.0) の培地 50 mL を 500 mL 坂口フラスコに分注し、120℃で20分殺菌した。これに酵母エキス 0.5% (w/v)、ペプトン 0.5% (w/v)、グリセロール 0.5% (w/v)、塩化ナトリウム 0.5% (w/v)、L-アラニンアミド塩酸塩 0.5% (w/v)、寒天 2% (w/v) (pH 7.0) を含む斜面培地で30℃、24時間培養した表1に示した微生物の菌体を1白金耳接種し、30℃、120往復/分、で20時間振とう培養を行った。培養後、菌体を遠心分離し、培養液と等量の生理食塩水にて2回洗浄し、再び遠心分離して菌体を集め、0.2 M トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0) にて懸濁し10 mL とした。菌体懸濁液 1 mL を L-アラニンアミド 62.5 mM、及び L-アスパラギン 250 mM を含む上記緩衝液 4 mL に添加し、全量を 5 mL とした後、30℃にて24時間反応をおこなった。対照実験として菌体無添加区を設定した。結果を表1に示した。

【0049】

【表 1】

微生物	生成 L-Ala-L-Asn(mM)
バチルス・メガテリウム FERM P-18421	0.4
コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13286	1.8
エルビニア・カロトボーラ FERM P-18420	0.5
ロドコッカス・ロドクロス ATCC19149	1.0
クリセオバクテリウム・メニンゴセプチカム ATCC13253	0.1
マイクロコッカス・ルテウス ATCC9341	0.1
シュードモナス・サッカロフィラ ATCC9114	0.1
クリプトコッカス・アルビドウス IFO610	1.8
トリコスポロン・グラシル ATCC24660	2.5
ロドスポリジウム・ジオボヴァツム ATCC22264	2.7
スポロブロマイセス・サーモニカラー IFO1038	1.5
トレメラ・フォリアセア IFO9297	3.3
トルラスポラ・デルプレッキイ IFO1083	2.9
ステリグマトマイセス・エルヴィアエ IFO1843	0.1
ロドトルラ・インゲニオサ ATCC22993	0.1
菌体無添加	検出限界以下

L-Ala-L-Asn:L-アラニル-L-アスパラギン

【0050】

実施例 2 コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13286 からの L-ア

ラニンアミドハイドrolラーゼの精製

酵素の力価の測定は以下のように行った。トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0) 200 μ mol、L-アラニンアミド 50 μ mol および適当量の酵素液を加え、全量が 1 ml となるように混合し、30℃にて、60分間反応させた後、リン酸水溶液 (pH 2.1) を 4 ml 加え反応を停止した。生成した L-アラニンは高速液体クロマトグラフィーにより定量した。1分間に 1 μ mol の L-アラニンを生成する酵素量を 1 単位とした。

【0051】

実施例 1 と同様にして、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13286 を 8 L 培養し、遠心分離により菌体を集めた。以下の操作は氷上あるいは 4℃にて行った。菌体を 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) にて洗浄後、0.1 mm 径のガラスビーズをもちいて約 10 分間破碎処理を行った。ガラスビーズと菌体破碎液を分離し、20,000 \times g、30 分の遠心分離にて破碎菌体片を除去し、無細胞抽出液を得た。更に 200,000 \times g、60 分の超遠心分離にて不溶性画分を除去し、上清液として可溶性画分を得た。得られた可溶性画分に硫酸アンモニウムを 60% 飽和になるように添加し、20,000 \times g、30 分の遠心分離によって沈殿を回収した。得られた沈殿を少量の 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に対して透析した。この酵素液を 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で予め平衡化した Q-Sepharose HP カラムに供し、0~1.0 M 塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) の直線的な濃度勾配で酵素を溶出させた。活性画分を集め、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で予め平衡化した Superdex 200 pg カラムに供し、同緩衝液で酵素を溶出させた。活性画分を集め、0.5 M 硫酸アンモニウムを含む 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に対して透析を行い、0.5 M 硫酸アンモニウムを含む 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で予め平衡化した Phenyl-Sepharose HP カラムに供した。0.5~0 M 硫酸アンモニウムを含む 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) の直線的な濃度勾配で酵素を溶出させた。活性画分を集め、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に対して透析し、これ

を 5 0 m M リン酸カリウム緩衝液 (p H 7 . 0) で予め平衡化した MonoQ カラムに供し、0 ~ 1 . 0 M 塩化ナトリウムを含む 5 0 m M リン酸カリウム緩衝液 (p H 7 . 0) の直線的な濃度勾配で酵素を溶出させた。こうして L - アラニンアミドヒドロラーゼを電気泳動適に均一に精製した。各精製過程における総タンパク量および比活性を表 2 に示す。

【 0 0 5 2 】

【表 2】

工程	総活性 (単位)	総タンパク (mg)	比活性 (単位 / mg)
無細胞抽出液	80	2000	0. 040
可溶性画分	71	1690	0. 042
硫酸アンモニウム分画	79	1080	0. 073
Q - Sepharose HP	56	379	0. 149
Superdex200pg	21	151	0. 135
Phenyl - Sepharose HP	12. 5	6. 60	1. 897
MonoQ	2. 4	0. 24	9. 841

【 0 0 5 3 】

実施例 3 L - アラニンアミドヒドロラーゼの分子量の評価

実施例 2 の方法により得られた精製酵素標品 0 . 5 μ g 相当をポリアクリルアミド電気泳動に供した。電気泳動緩衝液には 0 . 3 % (w / v) トリス、1 . 4 4 % (w / v) グリシン、0 . 1 % (w / v) ラウリル硫酸ナトリウムを、ポリアクリルアミドゲルはゲル濃度 1 0 ~ 2 0 % の濃度勾配ゲル (マルチゲル 1 0 ~ 2 0、第一化学薬品製)、分子量マーカーはバイオラッド製プレジジョンプレステインスタンダードをもちいた。電気泳動終了後、クーマシーブリリアントブルー R - 2 5 0 によってゲルを染色し、分子量 4 2 , 0 0 0 ~ 4 6 , 0 0 0 と算出される位置に均一なバンドが検出された。

【 0 0 5 4 】

実施例 4 L - アラニンアミドヒドロラーゼ至適 p H の評価

実施例 2 で均一に精製された L - アラニンアミドヒドロラーゼをもちいて、L - アラニンアミドを加水分解し、L - アラニンを生成する反応について反応 p

Hの評価を以下のように行った。緩衝液として、酢酸ナトリウム緩衝液（pH 3.0～6.0）リン酸カリウム緩衝液（pH 6.0～8.0）、トリス塩酸緩衝液（pH 7.0～9.0）、炭酸ナトリウム緩衝液（pH 8.0～10.0）、および、グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液を $200\ \mu\text{mol}$ 、L-アラニンアミド $50\ \mu\text{mol}$ および適当量の酵素液を加え、全量が $1\ \text{ml}$ となるように混合し、 30°C にて、60分間反応させ酵素活性を評価した。トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）をもちいた場合の活性を 100% とした結果を図 1 に示した。

【0055】

実施例 5 L-アラニンアミドヒドロラーゼ反応温度の評価

実施例 2 で均一に精製された L-アラニンアミドヒドロラーゼをもちいて、L-アラニンアミドを加水分解し、L-アラニンを生成する反応について反応温度の評価を以下のように行った。トリス塩酸緩衝液を $200\ \mu\text{mol}$ 、L-アラニンアミド $50\ \mu\text{mol}$ 、および適当量の酵素液を加え、全量が $1\ \text{ml}$ となるように混合し、 25 、 30 、 40 、 50 、 60°C にて、60分間反応させ酵素活性を評価した。反応温度 40°C の場合の活性を 100% とした結果を図 2 に示した。

【0056】

実施例 6 L-アラニル-L-アスパラギン、L-アラニル-L-グルタミンの製造

実施例 2 で均一に精製された L-アラニンアミドヒドロラーゼを、L-アラニンアミドと L-アスパラギン、もしくは、L-アラニンアミドと L-グルタミンに作用させ L-アラニル-L-アスパラギン、もしくは、L-アラニル-L-グルタミンを生成せしめた。L-アラニル-L-アスパラギンを得る場合はトリス塩酸緩衝液（pH 9.0） $200\ \mu\text{mol}$ 、L-アラニンアミド $50\ \mu\text{mol}$ 、L-アスパラギン $150\ \mu\text{mol}$ および L-アラニンアミドヒドロラーゼ活性 0.08 単位の酵素液を加え、全量が $1\ \text{ml}$ となるように混合した。L-アラニル-L-グルタミンを得る場合は、L-アスパラギン $150\ \mu\text{mol}$ のかわりに L-グルタミン $150\ \mu\text{mol}$ をもちいる以外は L-アラニル-L-アスパラギンを得る場合と同条件にて混合した。対照実験として基質のいずれか一方のみ

を用いるか、酵素無添加区を設定した。反応温度 30℃、10 時間反応し、目的生成物を定量した結果を表 3 に示した。

【0057】

【表 3】

基質		酵素添加	生成物	生成物濃度 (mM)
L-アラニンアミド	L-アスパラギン	あり	L-アラニル-L-アスパラギン	8.4
L-アラニンアミド	—	あり	L-アラニル-L-アスパラギン	検出限界以下
—	L-アスパラギン	あり	L-アラニル-L-アスパラギン	検出限界以下
L-アラニンアミド	L-アスパラギン	なし	L-アラニル-L-アスパラギン	検出限界以下
L-アラニンアミド	L-グルタミン	あり	L-アラニル-L-グルタミン	7.7
L-アラニンアミド	—	あり	L-アラニル-L-グルタミン	検出限界以下
—	L-グルタミン	あり	L-アラニル-L-グルタミン	検出限界以下
L-アラニンアミド	L-グルタミン	なし	L-アラニル-L-グルタミン	検出限界以下

【0058】

【発明の効果】

本発明のジペプチドの製造方法により、複雑な合成方法を経ることなく、比較的安価に入手可能な L-アミノ酸アミドと L-アミノ酸を用いてジペプチドを製造することができ、医薬品素材、機能性食品等として有用なジペプチドの製造コストダウンが可能となる。

【0059】

また、本発明の L-アミノ酸アミドヒドロラーゼは、本発明のジペプチドの製造方法に好適に使用することができるものである。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明のジペプチドの製造工程を示すフローチャートである。

【図 2】

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13286 由来の L-アミノ酸アミドヒドロラーゼの至適 pH 曲線を示す図である。

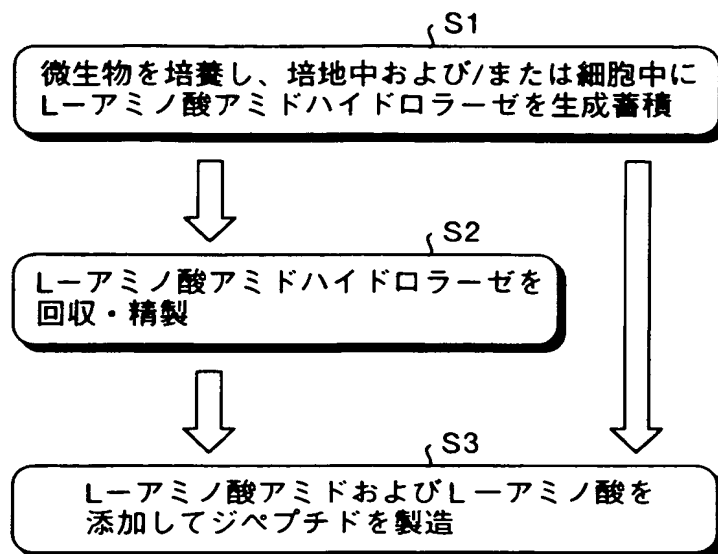
【図 3】

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13286 由来の L-アミノ酸ア

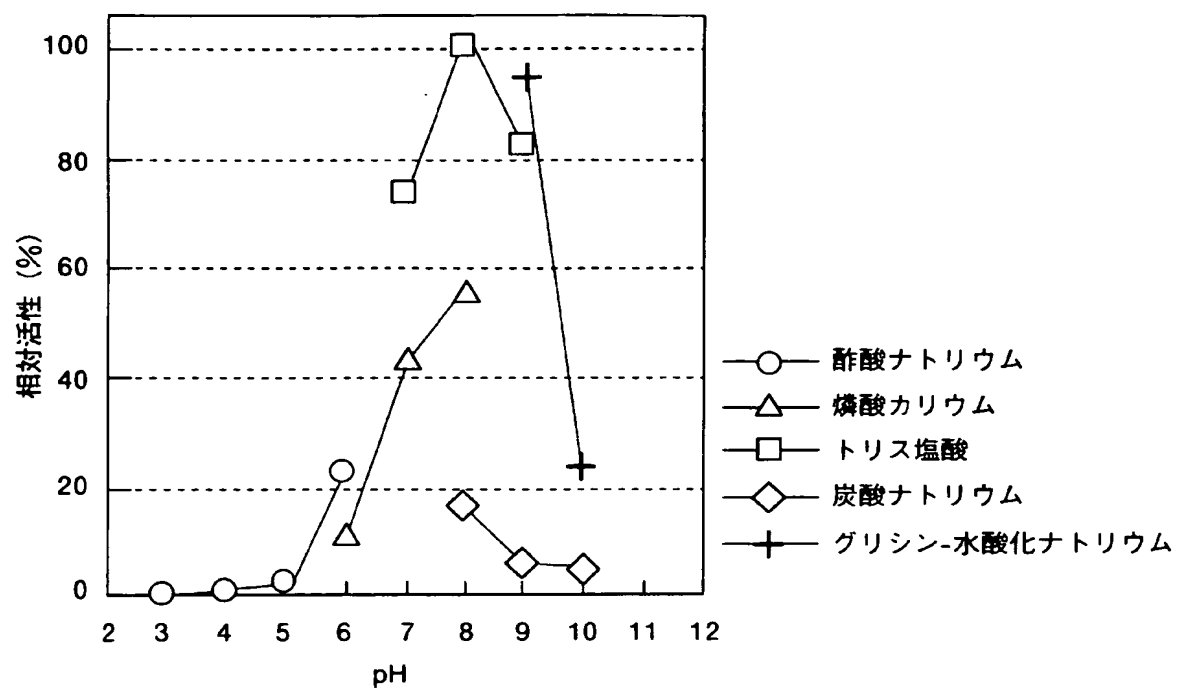
ミドハイドロラーゼの至適温度曲線を示す図である。

【書類名】 図面

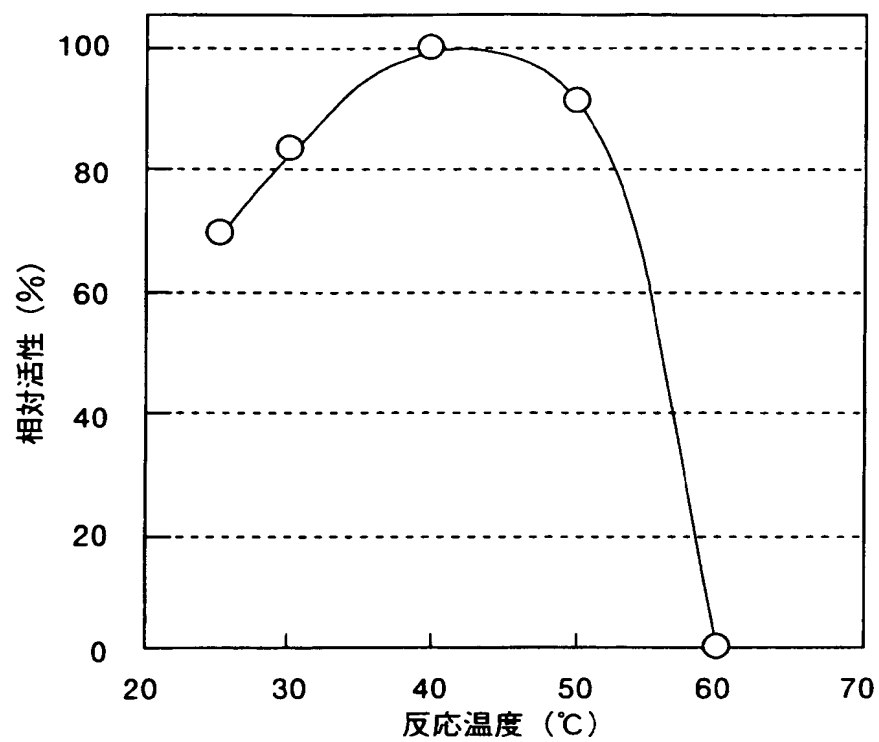
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 比較的安価に入手可能な出発原料を用いて、工業的に有利かつ簡便な経路でジペプチドを製造する方法を提供する。

【解決手段】 L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、または、該微生物の菌体処理物を用いて、L-アミノ酸アミドおよびL-アミノ酸からジペプチドを製造する。

【選択図】 なし



特願 2 0 0 1 - 2 2 6 5 6 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 0 0 6 6]

1. 変更年月日	1 9 9 1 年 7 月 2 日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都中央区京橋 1 丁目 1 5 番 1 号
氏 名	味の素株式会社